



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Kliniska vetenskaper

Aminosyrakoncentrationer i plasma hos hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi

Erika Uddenberg Kusmin

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:9*

Aminosyrakoncentrationer i plasma hos hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi

Plasma amino acid concentrations in horses with experimentally induced endotoxemia.

Erika Uddenberg Kusmin

Handledare: Katarina Nostell, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Johan Bröjer, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå,

A2E Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2014

Delnummer i serie: Examensarbete 2014:9

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: aminosyra, häst, grenade aminosyror, leucin, glutamin, tyrosin, glycin, endotoxin, lipopolysackarid, endotoxinemi, insulin, insulinresistens

Key words: amino acid, horse, amino acid metabolism, branched-chain amino acid, leucine, glutamine, tyrosine, glycine, insulin, insulin resistance, endotoxin, endotoxaemia, endotoxemia, lipopolysackarid

Sveriges Lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Endotoxinemi hos häst ses framförallt i samband med sjukdomar i mag- och tarmkanalen. De metabola rubbningarna och den utbredda inflammationen som endotoxinemin medför, gör att det är ett allvarligt tillstånd som kräver veterinärvård. Förändringar i aminosyrametabolismen har setts hos människor med experimentellt inducerad endotoxinemi och patienter med sepsis. Den kraftigt ökade muskelnedbrytning som endotoxinemi medför anses ha stor betydelse för patientens återhämtningsförmåga och prognos för överlevnad. Förutom aminosyrornas egenskaper som byggstenar för produktion av protein har de en viktig funktion för cellsignaler, bidrar till bevarandet av ett fullgott immunförsvar och hämmar cellskador. Enligt författarens vetskap har ingen vetenskaplig studie tidigare gjorts för att undersöka hur aminosyrametabolismen påverkas hos hästar med endotoxinemi, varken på patientmaterial eller hos hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi. Syftet med den här studien var att undersöka hur koncentrationerna av de grenade aminosyrorna, glutamin, glycin och tyrosin förändras i plasma vid experimentellt inducerad endotoxinemi. I studien inducerades endotoxinemi hos åtta varmbloodstravare, genom en sex timmars intravenös infusion av *Escherichia coli* endotoxin (O55: B5), totalt 500 ng/kg kroppsvikt. Blodprover för analys av plasmaaminosyrakoncentrationer togs vid olika tillfällen: fem prover togs vid fem olika tillfällen dygnet innan infusionen (baskoncentrationer), ett nollprov togs omedelbart före infusionens start, vidare togs prover varje timme under infusionen samt 1, 2, 3, 6, 10, 12 timmar efter infusionens slut. Därefter togs prover var tredje timme till 72 timmar efter infusionens slut. Trots att endotoxininfusionen endast orsakade relativt milda kliniska symtom, uppvisade hästarna förändringar i aminosyrametabolismen med markant minskade koncentrationer av isoleucin, glutamin samt tyrosin i plasma. Dessa förändringar inträffade under första dygnet efter endotoxininfusionen medan plasmakoncentrationerna av leucin och glycin steg under de två nästkommande dygnen efter endotoxininfusionen. Dessa förändringar är sannolikt relaterade till en ökad omsättning av dessa aminosyror då de är involverade i livsuppehållande processer såsom inflammationssvar och proteinuppbyggnad. Dessa resultat överensstämmer med resultat från humana studier på patienter med sepsis och tyder därför på att det finns likheter mellan hästens och människans aminosyrametabolism i samband med endotoxinemi. Resultaten visar att hästars aminosyrametabolism förändras vid experimentellt inducerad endotoxinemi, vilket sannolikt bidrar till den muskelförlust som ses hos svårt sjuka hästar och till svårigheter att tillfriskna. Mer forskning på ett större antal hästar behövs för att utreda hur hästars aminosyrametabolism förändras vid naturligt förekommande endotoxinemi, exempelvis till följd av akuta gastrointestinala lidanden såsom kolik. Detta för att bättre kunna anpassa den medicinska behandlingen efter hästens specifika metabola behov, till exempel genom parenterala näringslösningar. På sikt kan detta leda till bättre utvärdering och behandling av den svårt sjuka hästen samt till en förkortad konvalescenstid. Förhoppningsvis kan den här studien agera modell för fortsatt forskning som leder till att behandling och prognos för hästar med endotoxinemi förbättras.

SUMMARY

Endotoxemia is a serious and common feature in horses with gastrointestinal disorders, such as colic and colitis. Because of the extensive inflammatory response as well as the metabolic changes that occur during this condition these horses often need intensive care. Amino acids have several important functions during endotoxemia. Studies in human patients with sepsis and experimentally induced endotoxemia have shown that they exhibit severe disturbances in the amino acid metabolism. This is regarded to be one explanation for the long recovery often seen in these patients. To the knowledge of the author, there are no scientific studies that have investigated the influence on the amino acid metabolism of horses with naturally occurring or experimentally induced endotoxemia. The purpose of this study was to investigate the plasma levels of isoleucine and leucine (branched-chain amino acids), glutamine, glycine and tyrosine in horses with experimentally induced endotoxemia. Endotoxemia was induced in eight Standardbred trotters by a continuous intravenous infusion of *Escherichia coli* endotoxin (O55: B5), with a total dose of 500 ng/kg body weight. Blood samples for analysis of plasma amino acid concentrations were collected at different time points. Baseline samples were collected at regular intervals the day before, and immediately prior to the start of the infusion with endotoxin. Thereafter, blood samples were drawn every 60 minutes during the 6 hour infusion period, at 1, 2, 3, 6, 10 and 12 hours post-infusion, and then every third hour until 72 hours post-infusion. During the infusion, all horses showed signs of endotoxemia with increased body temperature, dark mucus membranes, depression, tachycardia, tachypnea and some of the horses showed mild colic signs. The concentrations of isoleucine, glutamine and tyrosine decreased significantly during the infusion period but returned to baseline levels within 24 hours after the end of the infusion. The concentrations of leucine and glycine started to increase during the post infusion period and were significantly increased compared to baseline values at 18 hours (leucine) and 48 hours (glycine) after the end of the infusion. The concentrations of plasma leucine and glycine had not returned to baseline values at 72 hours after the end of the infusion. The results of the present study indicate that horses with experimentally induced endotoxemia show similar alterations in plasma amino acid profile as have previously been reported in humans with experimentally induced endotoxemia and naturally occurring endotoxemia. These changes are probably related to the increased metabolic demand of amino acids involved in inflammatory response, protein synthesis and cell signaling that occur during endotoxemia. The changes in plasma amino acid could be one factor that contributes to the muscle loss seen in critical ill horses and for the long recovery period often seen in these patients. Further research is needed to investigate how the amino acid metabolism changes in horses with naturally occurring endotoxemia, for example as a consequence to acute gastrointestinal conditions such as colic. In the future, this may lead to a better evaluation and treatment of the critical ill horse and a shortened time of convalescence.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Endotoxinemi	2
Endotoxin	2
Förändrad metabolism vid endotoxinemi	2
Aminosyror	3
De grenade aminosyrorna	3
Mekanismen bakom de grenade aminosyrornas proteinreglerande förmåga	4
Leucin	4
Isoleucin och valin	4
Glutamin	4
Glycin	5
Tyrosin	5
Behandling av endotoxinemi	6
MATERIAL OCH METODER	7
Försöksupplägg	7
Hästar	7
Klinisk undersökning	7
Experimentellt protokoll	7
Förberedelser	7
Infusion	7
Provtagning	8
Analys	8
Statistik	8
RESULTAT	8
Kliniska symtom	8
Aminosyror	10
Isoleucin	10
Leucin	11
Glutamin	12
Glycin	13
Tyrosin	14
DISKUSSION	15
KONKLUSION	19
REFERENSER	20

INTRODUKTION

Endotoxiner är giftiga komponenter i gramnegativa bakteriers cellvägg och frisätts ut i blodet i samband med vissa svåra sjukdomstillstånd hos häst såsom kolik och kolit, svåra bakteriella infektioner och sepsis hos föl (Bayly, Reed & Sellon, 2010). Erfarenhetsmässigt och genom resultat från vetenskapliga studier vet man att hästar är extremt känsliga för endotoxiners verkningar (Burrows *et al.*, 1970). Endotoxinemi är en av de vanligaste dödsorsakerna hos hästar med gastrointestinala sjukdomar och förknippas med symtom som feber, svettningar, ökad andnings- och hjärtfrekvens, sänkt aptit och buksmärta (Bayly, Reed & Sellon, 2010).

Sepsis är inte lika vanligt hos häst som hos människa men symtomen hos hästar med endotoxinemi kan liknas vid dem som ses hos människor med sepsis (Gamrin *et al.*, 1997; Deng & Chai, 2009). Ämnesomsättningsrubbningsar som förhöjda glukos- och insulinnivåer samt insulinresistens ses hos både människa och häst vid endotoxinemi och sepsis (Freund *et al.*, 1978; Langouche & Van den Berghe, 2006; Tóth *et al.*, 2010; Sundström, 2011; Tadros *et al.*, 2013). Hos människa har man även sett förändringar i aminosyrametabolismen i samband med endotoxinemi och förlusten av muskelprotein vid svår sjukdom är en viktig orsak till fördröjd återhämtning och förlängd vårdtid (Gamrin *et al.*, 1997; Vary, 1998; Vesali *et al.*, 2005). De grenade aminosyrorna (valin, isoleucin, leucin) samt glutamin, glycin och tyrosin är viktiga vid endotoxinemi eftersom de bland annat bidrar till energiproduktion och ett gott immunförsvar, minskar inflammationen och är viktiga för att cellsignaleringsen (exempelvis insulinsignaleringsen) ska fungera (Platell *et al.*, 1993; Newsholme & Calder, 1997; Petrat *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2013; Ueki, Kondo & Kahn, 2004).

Ingen vetenskaplig studie har tidigare gjorts där hästars aminosyrametabolism vid endotoxinemi har studerats, varken på patientmaterial eller vid experimentellt inducerad endotoxinemi. Erfarenhetsmässigt vet man dock att svårt sjuka hästar, likt människor med sepsis, tappar mycket muskelmassa, något som sannolikt inte enbart kan relateras till inaktivitet. Det finns därför skäl att misstänka att svårt sjuka hästar drabbas av förändringar i aminosyrametabolismen och att detta kan påverka prognosen för tillfrisknande. Syftet med studien var därför att undersöka hur aminosyrakoncentrationerna i plasma förändras hos hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi, för att få mer kunskap om hur hästars aminosyrametabolism påverkas vid denna typ av sjukdomstillstånd.

LITTERATURÖVERSIKT

Endotoxinemi

Endotoxin

Endotoxin är en värmetålig lipopolysackardid (LPS) och beskrevs första gången av Richard Pfeiffer 1892 (Pfeiffer, 1892). LPS är en cellväggskomponent som finns hos alla gramnegativa bakterier och dess molekyl består av fyra domäner, vilka alla är nödvändiga för bakteriens virulens. Tidigare studier på häst har visat att endotoxiner har flera olika systemiska effekter. Bland annat initierar de en kraftig inflammationsreaktion som i sin tur kan ge cirkulationspåverkan, chock, organsvikt, rubbningar i koagulationen och hormonbalansen samt i metabolismen av glukos, fett och protein (Bayley, Reed & Sellon 2010; Boroni Moreira & de Cássia Gonçalves Alfenas, 2012; Boutry *et al.*, 2012).

Tillståndet endotoxinemi uppkommer när endotoxin frigörs till cirkulationen vilket kan ske antingen då bakterier förökar sig eller då de dör. Det är framförallt då gramnegativa bakterier dör som stora mängder endotoxiner frigörs. För att endotoxinemi ska uppstå och endotoxiner och andra bakteriella molekyler ska kunna göra skada måste stora mängder endotoxiner passera mag-tarmbarriären och överrumpla immunförsvaret, alternativt att leverns kapacitet att ta hand om och bryta ned endotoxinerna är nedsatt (Bayley, Reed & Sellon 2010).

Förändrad metabolism vid endotoxinemi

Hypermetabolism

Vid endotoxinemi och sepsis krävs mycket energi för att den drabbade ska kunna handskas med sjukdomen och upprätthålla ett gott immunförsvaret. Kroppen ställs in på katabolism och förändringar i kolhydrat-, fett- och proteinmetabolismen leder till förluster av muskelmassa och negativ kvävebalans. För att möta det ökade energibehovet sker återbildning av grenade aminosyror från ketosyror och aminosyrorna används av bland annat lever och njurar för återbildande av glukos (glukoneogenes) och proteinsyntes (Freund *et al.*, 1978; Gamrin *et al.*, 1997; Platell *et al.*, 2000; Holeček, 2002).

I en studie där man gav en intravenös injektion av en låg dos endotoxin till människa, för att efterlikna en tidig fas av sepsis, såg man minskade koncentrationer av alla aminosyror i plasma (däribland de som studeras i denna studie), samt ett ökat utflöde av aminosyror från muskulaturen ut i blodet (Vesali *et al.*, 2005). Den ökade efterfrågan av aminosyror vid endotoxinemi gör att aminosyrakoncentrationerna i plasma minskar, samtidigt som det sker en ökad muskelnedbrytning med efterföljande frisättning av aminosyror från muskulaturen för att täcka upp förlusterna. Detta resulterar i förlust av muskelprotein, vilket tar lång tid att återskapa och är en bidragande anledning till att det tar lång tid för svårt sjuka patienter att tillfriskna och återhämta sig (Gamrin *et al.*, 1997; Vesali *et al.*, 2005; Kamisoglu *et al.*, 2013).

Aminosyrametabolismen påverkas hos både människor och djur med endotoxinemi men även om det är känt att muskelförluster sker hos både människor och djur med svår sjukdom, är mekanismen bakom muskelförlusten inte fullständigt utredd (Gamrin *et al.*, 1997; Boutry *et al.*, 2012; Vesali *et al.*, 2005). Förutom den extensiva muskelproteolysen som sker vid endotoxinemi och sepsis, minskar endotoxiner upptaget av aminosyror i tarmen vilket också bidrar till en sänkt koncentration av aminosyror i blodet (Bayly, Reed, & Sellon, 2010; Boroni Moreira & de Cássia Gonçalves Alfenas, 2012; Boutry *et al.*, 2012).

Insulinresistens

Vid endotoxinemi drabbas både människor och hästar av insulinresistens och det är bland annat stressen som den ökade metabolismen innebär, inflammationen samt endotoxinerna som bidrar till den nedsatta insulinkänsligheten (Tóth *et al.*, 2010; Sundström, 2011; Boroni Moreira & de Cássia Gonçalves Alfenas, 2012; Tadros *et al.*, 2013). Insulin har flera olika funktioner och reglerar inte bara upptaget av glukos och fett till cellerna utan stimulerar även upptaget av aminosyror till cellen. Det är därför tänkbart att insulinresistens kan påverka upptaget av aminosyror i detta fall (Lu *et al.*, 2013).

Aminosyror

Allt levande är beroende av protein som byggstenar. De ingår i enzymer och hormoner som reglerar metabolismen, som kontraktile proteiner i muskulatur, i blodet som transportörer och i vårt immunförsvar som antikroppar. Protein finns således i många former med olika egenskaper. Gemensamt mellan de olika proteinerna är dock deras strukturella uppbyggnad. Alla proteiner är uppbyggda av linjära polymerer av aminosyror. Det finns mer än 300 kända aminosyror men när det pratas om aminosyror i dagligt tal så avses oftast någon av de 20 aminosyror som finns som beståndsdelar i protein hos däggdjur (Champe & Harvey, 2008).

De grenade aminosyrorna

De grenade aminosyrorna leucin, isoleucin och valin behövs specifikt för tillverkning av protein. De tillhör nio av de aminosyror som inte kan syntetiseras av kroppen utan måste tillföras med födan och deras metabolism sker till största delen i skelettmuskulatur, till skillnad från de andra aminosyrorna som framförallt metaboliseras av levern (Buse & Reid, 1975; Harper, Miller & Block, 1984; Platell *et al.*, 2000).

De grenade aminosyrorna är livsnödvändiga för reglering av proteinmetabolism och glukosbalans (Manders *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013). De stimulerar muskelproteinsyntes, hämmar proteinnedbrytning samt verkar stimulerande på glukosupptag i skelettmuskulatur och förbränning (oxidation) av glukos i resten av kroppen (Buse & Reid, 1975; Platell *et al.*, 2000; Greiwe *et al.*, 2001; Kimball & Jefferson, 2004). I muskulatur utgör de grenade aminosyrorna viktiga energisubstrat och byggstenar för andra aminosyror och protein (Platell *et al.*, 2000; Greiwe *et al.*, 2001; Kimball & Jefferson, 2004).

I en studie där man tog muskelbiopsier av humana intensivvårdspatienter med några dagars mellanrum, sågs en ökning av de grenade aminosyrorna i muskulatur. Det kan förklaras med att en kontinuerlig nedbrytning av protein (proteolys) sker under svåra sjukdomstillstånd för att kunna förse kroppen med aminosyror (Gamrin *et al.*, 1997). Aminosyrornas metaboliter används som energi och till bildning och bevarande av olika protein (Freund *et al.*, 1978; Platell *et al.*, 2000). De grenade aminosyrorna utgör den viktigaste källan för glutaminsyntes i muskulatur och eftersom glutamin stimulerar till proliferation av immunförsvarsceller, anses de grenade aminosyrorna även bidra till ett fungerande immunförsvar (Holeček *et al.*, 2002).

Mekanismen bakom de grenade aminosyrornas proteinreglerande förmåga

The mammalian target of rapamycin (mTOR) är ett protein i kroppen som har en central roll för celltillväxt och muskelhypertrofi (Kimball & Jefferson, 2004). Fosforylering av proteinet 4E-BP1 verkställer mTORs effekt och P70S6-kinas ingår i det cellsignaleringsystem där mTOR verkar. Infusion av grenade aminosyror har hos människa visat sig stimulera p70S6-kinas samt 4E-BP1 i skelettmuskulatur (Greiwe *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006). Fosforylering och aktivering av P70S6-kinas är starkt förknippat med muskelhypertrofi (Baar & Esser, 1999).

Leucin

Leucin upptäcktes redan år 1820 och är den grenade aminosyra som framförallt stimulerar proteinsyntesen (Braconnot, 1820; Buse & Reid, 1975; Fulks, Li & Goldberg, 1975; Kimball & Jefferson, 2004; Gannon & Nuttall, 2010). Oralt intag av leucin ger en direkt fosforylering och aktivering av mTOR i skelettmuskulatur vilket bidrar till muskelproteinsyntes (Kimball & Jefferson, 2004).

In vitro studier med β -celler från bukspottkörteln visar att leucin och isoleucin stimulerar insulinets effekt (Manders *et al.*, 2012). Leucin är den aminosyra av de grenade aminosyrorna som starkast stimulerar insulinreceptorers substrat, vilket potentierar insulinets effekt och stimulerar insulinsignaleringen (Tzatsos & Kandror, 2006).

Isoleucin och valin

Isoleucin och valin tillhör också de grenade aminosyrorna och har liknande egenskaper som leucin. Aminosyrorna måste tillföras med födan och precis som leucin används de specifikt för tillverkning av protein i kroppen (Platell *et al.*, 2000).

Glutamin

Glutamin är egentligen en icke essentiell aminosyra men vid svåra sjukdomstillstånd är glutamin livsnödvändig för att upprätthålla god tarmhälsa och ett gott immunförsvar. De grenade aminosyrorna är de huvudsakliga kvävekällorna för tillverkning av glutamin i muskulatur och metabolismen av glutamin regleras till stor del av dessa aminosyror (Platell *et al.*, 1993; Platell *et al.*, 2000).

Utan glutamin kan lymfocyter inte proliferera *in vitro* och syntes av flera interleukiner är också glutaminberoende. I levern bidrar glutamin med tillverkning av glukos och används bland annat till produktion av glutamat, aspartat, laktat och ammonium (Platell *et al.*, 2000).

I samband med livshotande katabola tillstånd hos människa då man har en kraftig nedbrytning av muskulatur har man sett en minskning av glutamin i plasma och muskel vilket kan relateras till att mer glutamin förbrukas än vad som hinner bildas (Oudemans-van Straaten *et al.*, 2001). Hela två tredjedelar av det totala utsläppet som sker av aminosyror från muskulatur vid svår sjukdom består av aminosyrorna glutamin och alanin. Hos intensivvårdpatienter har man sett att koncentrationerna av glutamin i muskulatur sjönk till en fjärdedel av den normala koncentrationen. Koncentrationerna var sedan fortsatt låga under hela intensivvårdsvistelsen. Hos patienter med stort kirurgiskt trauma minskade glutaminkoncentrationerna med 30-50 %. Sänkningen av glutamin beror framförallt på en ökad nedbrytning av glutamin i snabbt delande celler, exempelvis enterocyter, benmärgsceller och lymfocyter. (Gamrin *et al.*, 1997).

Eftersom musklerna hos en långvarigt svårt sjuk människa inte klarar av att upprätthålla plasmakoncentrationerna av glutamin, blir patienten helt beroende av exogen tillförsel. Studier visar att tillförsel av glutamin till patienter som undergår kemoterapi ger ökad intestinal tillväxt och minskad atrofi (Souba *et al.*, 1990). Låga glutaminkoncentrationer i plasma hos en intensivvårdspatient inom humanvården förknippas med dålig prognos och död (Oudemans-van Straaten *et al.*, 2001).

Glycin

Glycin är en icke essentiell aminosyra som tillverkas hos däggdjur av aminosyran serin. Studier på råttor har visat att glycin motverkar endotoxin-inducerad chock och minskar risken för ischemiska skador vid endotoxemi. Mekanismen bakom denna skyddande effekt är okänd men det anses ha att göra med att glycins antiinflammatoriska egenskaper (Petrat *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2013).

Tyrosin

Tyrosin är en icke essentiell aminosyra och tillverkas av aminosyran fenylalanin. Tyrosin har en viktig roll i signaleringen mellan celler, bland annat för insulinsignaleringen eftersom tyrosin bidrar till aktivering av insulinreceptorn och därför möjliggör insulinsignalering (Ueki, Kondo & Kahn, 2004). Så kallade Protein tyrosine kinaser (PTKs) har förmågan att flytta en fosfatgrupp från ATP till tyrosin. När tyrosin är placerad på substratet till en receptor kommer denna fosforylering att bidra till aktivering av receptorn och att dess målprotein kan binda in (Hubbard & Till, 2000).

Vid endotoxemi påverkar endotoxiner tyrosin så att aminosyran inte kan aktivera receptorer normalt. Att tyrosin inte fosforyleras normalt vid endotoxemi tros bidra till de vaskulära förändringar med nedsatt mikrocirkulation som ses vid endotoxemi och får även konsekvenser för insulinreceptorn med nedsatt insulinsignalering som följd (Ueki, Kondo & Kahn, 2004; Lehmann *et al.*, 2007).

Behandling av endotoxinemi

Endotoxinemi hos häst behandlas framförallt med antiinflammatoriska medel (NSAID), intravenös vätsketerapi och plasma. Hästar med endotoxinemi har ofta hypovolemisk chock varför det är viktigt att återställa vätskebalansen genom att ge intensiv vätsketerapi initialt och sedan ha målsättningen att vidmakthålla ett normalt blodtryck och en optimal vävnadsperfusion (Bayly, Reed & Sellon, 2010).

Vid endotoxinemi kan en minskad mikrocirkulation bidra till multiple organ dysfunction syndrome, MODS, och att patienten avlider. En förbättrad vävnadsperfusion är därför ett viktigt mål i behandlingen av endotoxinemi. Intravenös infusion av specifika aminosyror till möss med experimentellt inducerad endotoxinemi har visat sig kunna öka mikrocirkulationen i tarmen (Wijnands *et al.*, 2012). Polymyxin B används också ibland för att behandla endotoxinemi hos häst. Det är ett antibiotikum med förmågan att neutralisera endotoxiner (Bayly, Reed & Sellon, 2010). Mer specifika behandlingar som tillförsel av antikroppar mot *E. coli* eller cytokinen TNF- α samt behandlingar med insulin förekommer men är ännu inte allmänt vedertagna inom hästmedicinen i Sverige (Spier *et al.*, 1989; Sykes & Furr, 2005).

Aminosyror har länge varit intressanta inom humanforskningen för behandling av den svårt sjuke patienten och tack vare deras anabola och inflammationshämmande egenskaper är de givna komponenter i parenterala näringslösningar inom humansjukvården (Platell *et al.*, 2000; *et al.*, 2011). Den humana intensivvårdspatienten får näringslösningar parenteralt (i blodet), något som ofta orsakar atrofi av tarmen, det vill säga att tarmen förtvinar. Parenteral näringslösning som berikats med glutamin har visat sig hämma celldöd hos tarmepitel och bidra till bevarande av en intakt tarmbarriär hos råttor (Han *et al.*, 2013). Möss som fått en parenteral näringslösning berikad med glutamin och grenade aminosyror erhöll minskad atrofi av tarmvävnad i jämförelse med de som inte fick lösningen berikad med aminosyror (Platell *et al.*, 1993).

Att bevara muskelprotein är också en viktig del i behandlingen av inflammationstillstånd som endotoxinemi. Utan muskulatur kan inte aminosyror som exempelvis glutamin bildas och det blir då svårt för den septiska patienten att upprätthålla god tarmhälsa och ett fungerande immunförsvar (Platell *et al.*, 2000).

Mekanismen bakom aminosyrornas positiva effekter vid parenteral giva är inte fullständigt utredd. Glutamin tros dock bidra till en intakt tarmbarriär genom att aminosyran påverkar cellsignalerings så att tarmväggen blir mindre genomsläpplig för skadliga molekyler. Glutamin stimulerar även till ökad tillverkning av antioxidanter i tarmen (Han *et al.*, 2013). Vid parenteral giva av glutamin har man även sett färre infektioner hos intensivvårdspatienter och grenade aminosyror som getts parenteralt efter gastrointestinala operationer förbättrar kvävebalansen hos patienterna (Yarandi *et al.*, 2011).

MATERIAL OCH METODER

Försöksupplägg

Mellan september 2009 och mars 2010 genomfördes denna studie som en prospektiv experimentell försöksstudie. Det etiska tillståndets diarienummer är C171/9. Hästarna i studien gavs en intravenös infusion av endotoxin och provtogs vid olika tillfällen med avseende på aminosyrakoncentrationer före, under och efter infusionen.

Hästar

I studien deltog åtta friska hästar, samtliga varmblodiga travhästar. Av dessa var fem ston och tre valacker, med kroppsvikter från 403 till 570 kg och i åldrarna 3-14 år. Hästarna hölls inackorderade i boxar under försöket med daglig utevistelse och gavs en standarddiet bestående av hö tre gånger dagligen och hade fri tillgång till vatten. Samtliga ägdes av Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet.

Klinisk undersökning

Ingen av hästarna hade några avvikande fynd på den kliniska undersökningen eller vid den endoskopi av luftvägarna som gjordes innan studien påbörjades. En fullständig blodstatus (CBC, Complete Blood Cell Count) togs innan studiens början, ingen av hästarna hade värden utanför referensområdet på någon av parametrarna.

Experimentellt protokoll

Förberedelser

Varje häst försågs med en venkateter i vänster och höger jugularven. En kateter var för endotoxemiinfusion (Intranule, 2,0 x 105 mm, Vygon, Ecouen, France) och en för blodprovstagning (Milacatch, 1,3 x 13 cm, 14 gauge x 5.25 inch, Mila International, Inc, Erlanger, KY, USA). Innan katetern sattes på plats bedövades området med lokalbedövning (Lidocain 2 %, AstraZenica AB, Södertälje). När dessa förberedelser var klara fick hästarna vila i minst 30 minuter. De gavs hö och släpptes in i sina boxar.

Infusion

Försöket startades mellan klockan 08.00 och 09.00. Under sex timmar fick varje häst en jämn, intravenös infusion i jugularvenen av *Escherichia coli* endotoxin (*Sigma Alderich L5418*,

O55: B5). Infusionshastigheten var 140 ml/h och endotoxindosen 83,3 ng/kg/h, utspädd i 840 mL isoton natriumklorid (*Natriumklorid, 9mg/mL, Fresenius Kabi*). Den totala dosen var 500 ng/kg kroppsvikt.

Provtagning

Kroppstemperatur och hjärtfrekvens (auskultation) registrerades innan endotoxininfusion och monitorerades varje timme under infusionen samt vid 1, 2, 3, 6, 10 och 24 timmar efter infusionen. Efter detta monitorerades i välfärdssyfte kroppstemperatur och hjärtfrekvens vid regelbundna intervall till 72h efter infusionen. Blodprover för aminosyraanalys togs i 10 ml litium heparinrör (BD Vacutainer LH, Belliver Industrial Estate). Hästarna var sina egna kontroller och fem basblodprover togs 23, 20, 17, 14, 12 timmar innan infusionsstart. Ett nollprov togs precis innan endotoxininfusionen och därefter togs blodprover var 60e minut under de sex timmar som infusionen pågick samt vid 1, 2, 3, 6, 10, 12 timmar efter infusionen och därefter var tredje timme till 72 timmar efter infusionen. Blodproverna förvarades på is (+ 4 °C, 906 g, under 10 min) fram till centrifugeringen gjordes (10 min i 4000 rpm). Plasma separerades från provet och frystes in i Eppendorffrör till – 80 °C inom 15 minuter efter att provet tagits. Proverna förvarades i fryst tillstånd fram till analys som skedde inom sex månader efter provtagning.

Analys

Koncentrationen av aminosyror ($\mu\text{mol/L}$) mättes med en modifierad HPLC-teknik (reversed phase) enligt Lowry och Passoneau.

Statistik

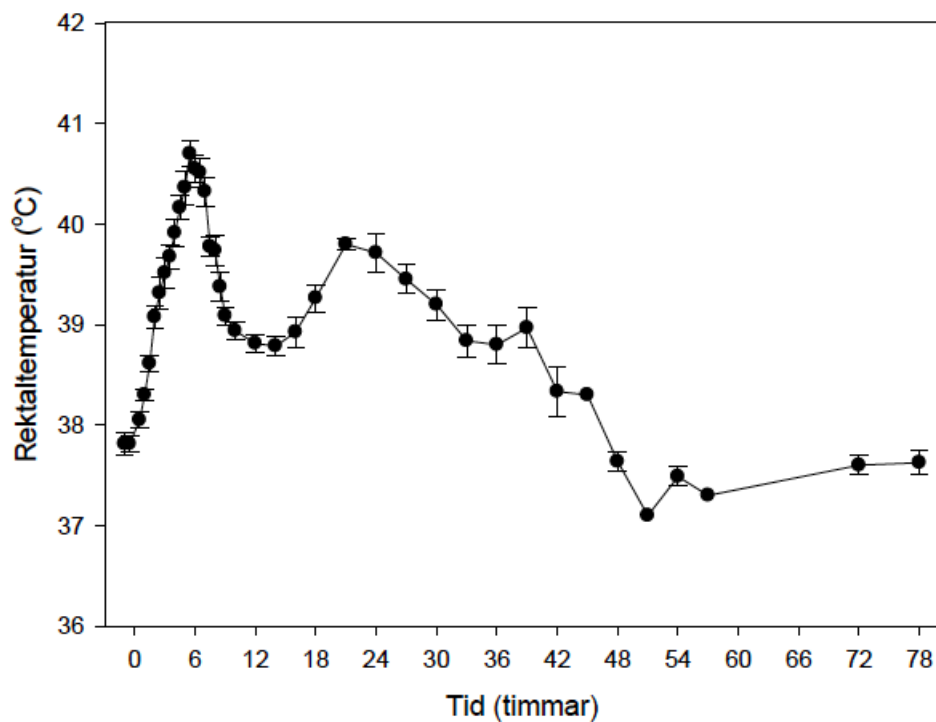
De statistiska analyserna gjordes i programmet JMP Pro 9.0.2. Resultaten från studien analyserades med en *one way* ANOVA för upprepade mätningar och jämfördes med Tukey-Kramer HSD. Resultaten redovisas som medelvärden \pm standardavvikelse (SD). Gränsvärde för statistisk signifikans sattes till $p < 0,05$. Hantering av analysresultat gjordes i *Matlab R2013a*.

RESULTAT

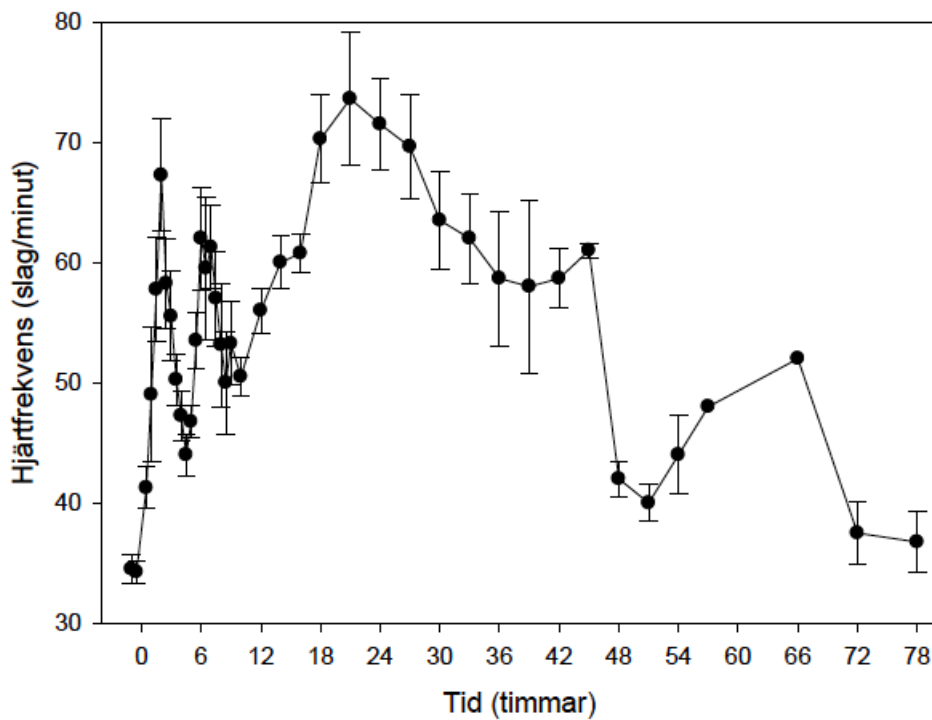
Kliniska symtom

Samtliga hästar i studien fick förhöjd kroppstemperatur (se figur 1), missfärgade slemhinnor, ökad andnings- och hjärtfrekvens (se figur 2), minskad aptit och några av hästarna uppvisade även lindriga koliksymtom under endotoxininfusionen. Ungefär en timme efter infusionens start fick alla hästar kraftigt minskade tarmljud vilket tyder på en kraftigt nedsatt tarmmotorik. De minskade tarmljuden kvarstod hos alla hästar till några timmar efter infusionens slut, förutom hos en häst som fick tillbaka normala tarmljud först 2,5 dygn efter infusionens slut.

Fem av åtta hästar hade lös avföring under endotoxininfusionen. Under infusionen sågs nedsatt törst och aptit hos alla hästar. Hos en häst återkom aptiten redan under slutet av infusionen medan för fyra hästar tog det 0,5-4 timmar efter infusionens slut att återfå aptiten, för två hästar tog det ett dygn efter infusionens slut och för en häst tog det 40 timmar efter infusionens slut.



Figur 1. Graf över hästarnas rektaltemperatur (medelvärde och standardfel för medelvärde) under 78 timmar med början vid endotoxininfusionens start (= tid 0).

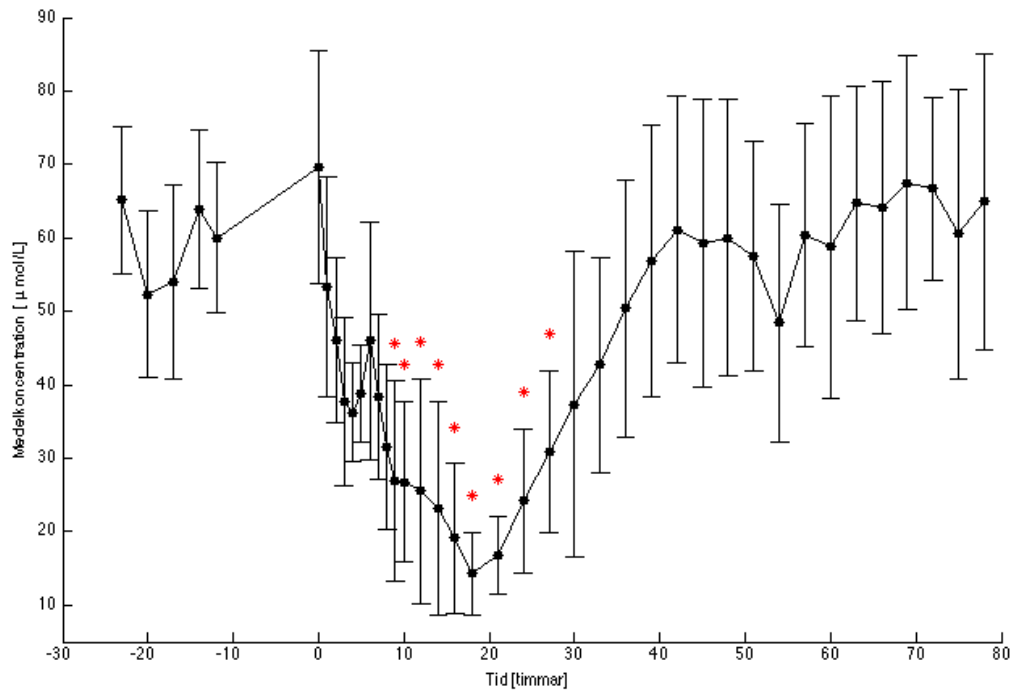


Graf 2. Graf över hästarnas hjärtfrekvens (medelvärde och standardfel för medelvärde) under 78 timmar med början vid endotoxininfusionens start (= tid 0).

Aminosyror

Isoleucin

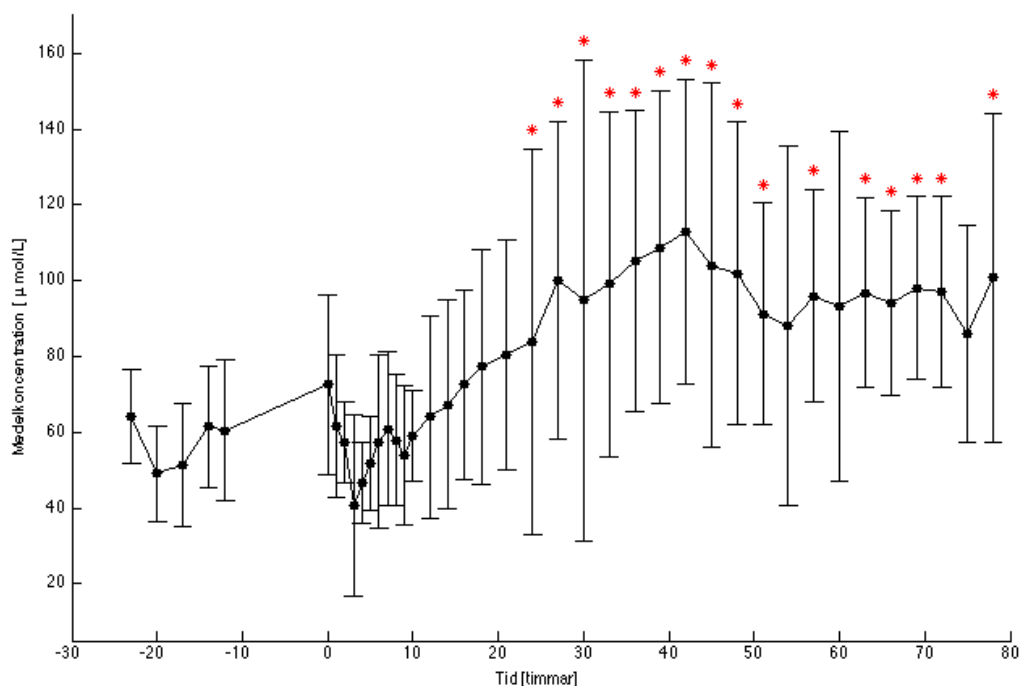
Koncentrationen av isoleucin sjönk succesivt under endotoxininfusionen och låg signifikant lägre än basproverna 2 timmar efter infusionens slut och låg kvar på dessa låga koncentrationer under de första 22 timmarna efter infusionens slut. Tjugofyra timmar efter infusionens slut var plasma isoleucinkoncentrationerna ej signifikant skilda från baskoncentrationerna.



Figur 3. Plasmakoncentrationen av isoleucin (medelvärde och standardavvikelse) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd-stjärna markerar signifikant skillnad mot baskoncentrationerna ($P < 0,05$).

Leucin

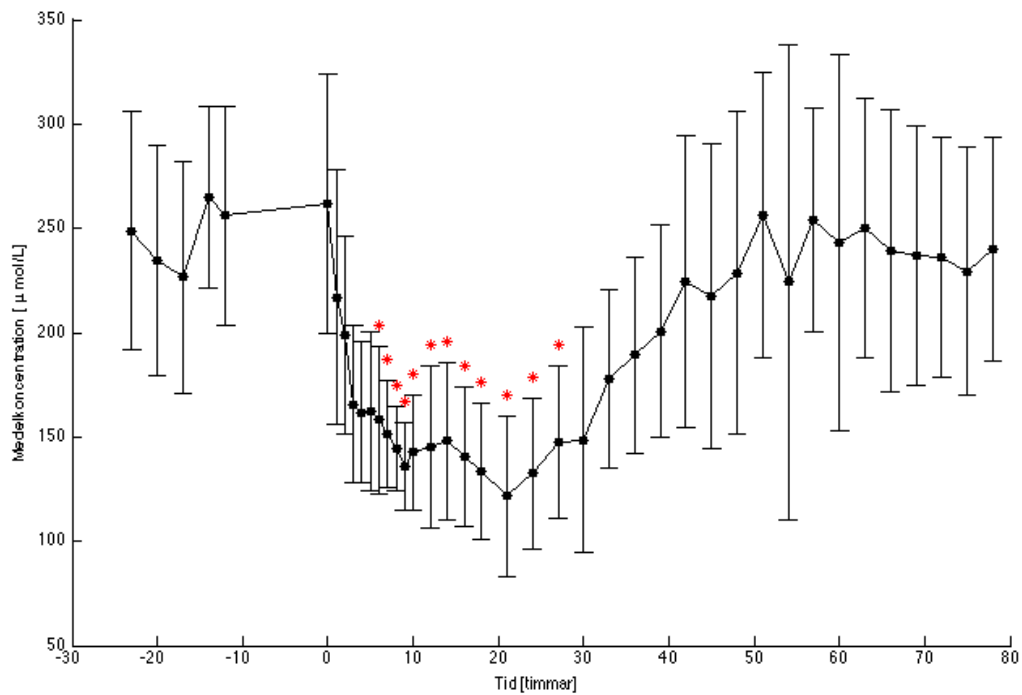
Plasmakoncentrationen av leucin steg succesivt efter infusionens slut och var signifikant högre än baskoncentrationerna knappt 18 timmar efter det att endotoxin infusionen avslutats och två dygn framåt, d.v.s så länge studien pågick.



Figur 4. Plasmakoncentrationen av leucin (medelvärde och standardavvikelse) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd-stjärna markerar signifikant skillnad mot baskoncentrationerna ($P < 0,05$).

Glutamin

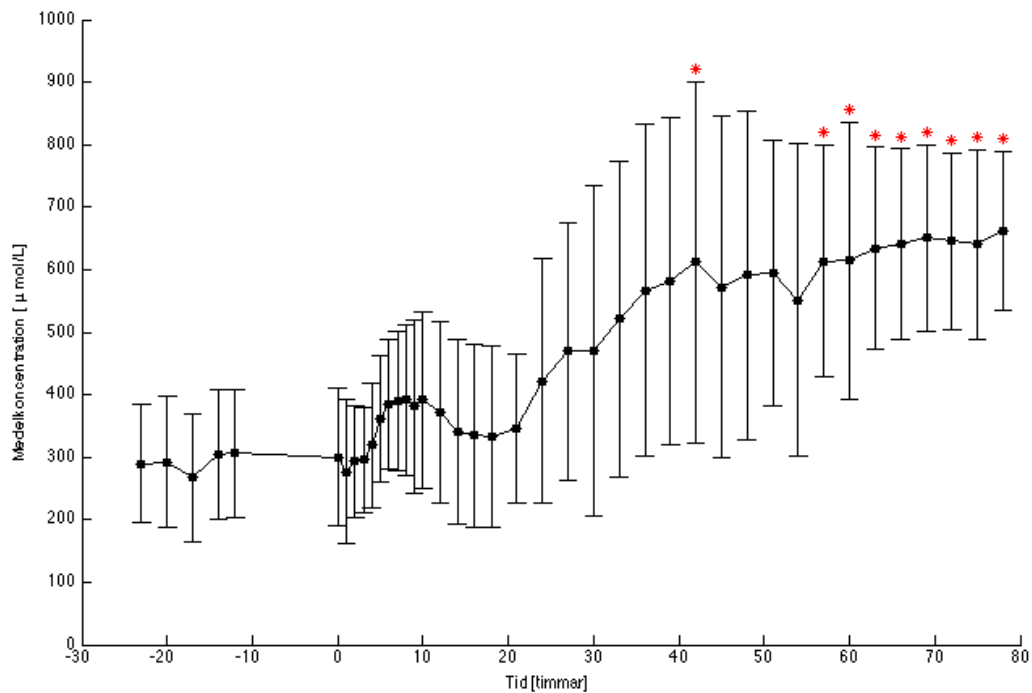
Koncentrationen av glutamin sjönk successivt under endotoxininfusionen och låg signifikant lägre än baskoncentrationerna efter 5 timmars infusion och under de första 22 timmarna efter infusionens slut. Plasmakoncentrationen av glutamin var ej signifikant skild från baskoncentrationerna 22 timmar efter infusionens slut.



Figur 5. Plasmakoncentrationen av glutamin (medelvärde och standardavvikelse) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd stjärna markerar signifikant skillnad mot baskoncentrationerna ($P < 0,05$).

Glycin

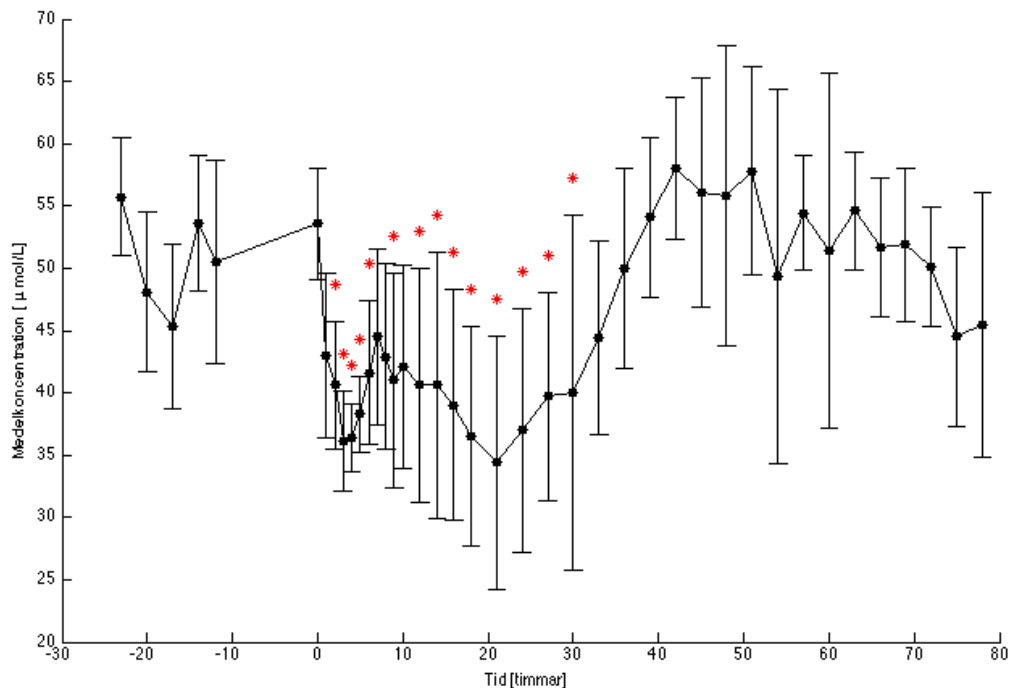
Ingen skillnad i glycinkoncentration kunde noteras under själva infusionen men glycinkoncentrationen i plasma steg gradvis efter ca ett dygn och nådde signifikant högre koncentrationer jämfört med baskoncentrationerna ca 2 dygn efter infusionens slut och låg kvar högt under det återstående sista dygnet.



Figur 6. Plasmakoncentrationen av glycin (medelvärde och standardavvikelse) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd-stjärna markerar signifikant skillnad mot baskoncentrationerna ($P < 0,05$).

Tyrosin

Under endotoxininfusionen sjönk koncentrationen av tyrosin och låg signifikant lägre än baskoncentrationerna efter en timmes infusion samt under det första dygnet efter infusionens slut. Tjugofyra timmar efter infusionens slut var tyrosinkoncentrationerna ej signifikant skilda från baskoncentrationerna.



Figur 7. Plasmakoncentrationen av tyrosin (medelvärde och standardavvikelse) under tiden före (baseline) och efter endotoxininfusionens start (tiden 0). Röd-stjärna markerar signifikant skillnad mot baskoncentrationerna ($P < 0,05$).

DISKUSSION

Denna studie visar att hästar med experimentellt inducerad endotoxinemi uppvisar liknande förändringar i plasmaaminozyrakoncentrationer som de man ser hos människor med sepsis och experimentellt orsakad endotoxinemi (Vesali *et al.*, 2005; Kamisoglu *et al.*, 2013). Trots att endotoxininfusionen endast orsakade relativt milda kliniska symtom uppvisade hästarna markanta förändringar i aminosyrametabolismen med minskade koncentrationer av isoleucin, glutamin samt tyrosin i plasma (se figur 3, 5, 7). Dessa förändringar inträffade under första dygnet efter endotoxininfusionen medan plasmakoncentrationerna av leucin och glycin steg betydligt senare i förloppet (se figur 4, 6).

Isoleucin, glutamin samt tyrosin har viktiga funktioner för immunförsvaret, varför det är logiskt att dessa förändringar inträffar tidigt i sjukdomsförloppet då det är under själva endotoxininfusionen som den inflammatoriska processen är som kraftigast. Endotoxinemi och sepsis leder till en ökad energiförbrukning och eftersom grenade aminosyror är viktiga för energi- och proteintillverkning vid dessa tillstånd, bidrar detta sannolikt till att isoleucinkoncentrationerna minskar under endotoxininfusionen (se figur 3). (Freund *et al.*, 1978; Platell *et al.*, 2000). Att koncentrationerna av aminosyror minskar i både plasma och muskulatur, tyder på att kroppen inte hunnit möta den ökade efterfrågan som sker (Vesali *et*

al., 2005). Den nedsatta tarmmotoriken som noterades hos hästarna under och timmarna efter infusionen påverkar troligtvis också de minskade koncentrationerna av aminosyror.

Vid tidigare studier där man tagit blodprover från människor med konstaterad sepsis fann man högre totalkoncentration av aminosyror i plasma än normalt, vilket framförallt berodde på höga koncentrationer av aromatiska och sulfatiska aminosyror. De grenade aminosyror och bland annat glycin låg kvar på normala koncentrationer (Freund *et al.*, 1978). Detta kan bero på att patienter med konstaterad sepsis fått mer tid att möta den ökade efterfrågan av aminosyror än de med en tidig endotoxinemi eller sepsis. Muskelnedbrytningen har då kommit igång och bidrar till höga aminosyrakoncentrationer i plasma samt att koncentrationerna av de grenade aminosyror och glycin har hunnit normaliseras.

Minskade glutaminkoncentrationer i blod har setts hos möss med endotoxinemi och anses bero på ett minskat upptag av aminosyror i tarmen (Boutry *et al.*, 2012). Man har även sett att immunförsvarsceller förbrukar glutamin vid svår sjukdom och trauma (Newsholme & Calder, 1997), vilket kan förklara varför glutaminkoncentrationerna i plasma sjunker under endotoxininfusionen (se figur 5).

Glycin har en förmåga att motverka ischemi och celldöd, bland annat tack vare sina inflammationshämmande egenskaper (Petrat *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2013). Att glycin stadigt stiger under och efter endotoxininfusionen kan därför tolkas som att kroppen producerar mer glycin för att hämma inflammationen och de cellskador som endotoxiner orsakar (se figur 6).

Att tyrosin sjunker under endotoxininfusionen kan associeras med att endotoxiner försämrar tyrosins effekt (se figur 7) (Ueki, Kondo & Kahn, 2004; Lehmann *et al.*, 2007). Om det katabola tillståndet bidrar till att mindre tyrosin bildas, alternativt förbrukas i större utsträckning, kan det förklara sänkningen i tyrosinkoncentration som ses. Tyrosin har en viktig roll i insulinsignaleringen och den minskade koncentrationen av tyrosin under endotoxininfusionen kan kanske bidra till den insulinresistens som ses hos hästar med endotoxinemi (Ueki, Kondo & Kahn, 2004; Tóth *et al.*, 2010; Sundström, 2011; Boroni Moreira & de Cássia Gonçalves Alfenas, 2012; Tadros *et al.*, 2013).

Hästarna i denna studie visade sena förändringar i metabolismen av leucin och glycin, med stegrade koncentrationer av dessa aminosyror ett respektive två dygn efter infusionens slut. Att koncentrationerna av dessa aminosyror stiger i plasma kan bero på en ökad nedrytning av muskelvävnad alternativt en ökad syntes från levern till följd av det ökade metabola kravet. Hos människa följs en ökad nedbrytning av muskelprotein vid endotoxinemi av ett ökat utsläpp av aminosyror från muskulatur till cirkulationen (Gamrin *et al.*, 1997; Vesali *et al.*, 2005). Denna process sker inte momentant och skulle kunna förklara de sena stegringarna vi ser. I studien mättes inte blodflödet i vena porta och vi vet heller inte hur mycket som filtreras ut via njurarna eller bryts ned från muskulatur. Detta kan också påverka resultaten och vi kan därför inte uttala oss om vad som sker i detta specifika fall. En ökning av de grenade aminosyror i cirkulationen bidrar till tillverkning av glutamin vilket i sin tur minskar nedbrytningen av de grenade aminosyror (Holeček, 2002), vilket också skulle kunna

förklara varför leucinkoncentrationerna stiger efter infusionen och når koncentrationer som ligger högre än innan försöket (se figur 4).

Vid försöket mättes även insulinkänsligheten hos hästarna och det visade sig att alla åtta hästar fick nedsatt insulinkänslighet timmarna efter endotoxin-infusionen. De fullständiga resultaten av detta går att finna i ett annat examensarbete (Sundström, 2011). Vid endotoxinemi och sepsis ses insulinresistens hos både människa och häst, vilken anses initieras av flera olika faktorer. Bland annat bidrar inflammationsfaktorer som TNF- α och IL-6 till försämrad insulinkänslighet (Deng & Chai, 2009; Sundström 2011; Tadros *et al.*, 2013). Endotoxiner kan även direkt bidra till nedsatt insulinkänslighet genom att de interagerar med Toll-likareceptorer (Boroni Moreira & de Cássia Gonçalves Alfenas, 2012). Dessa är potentiellt bidragande faktorer till den insulinresistens som ses i försöket.

Förhöjda plasmakoncentrationer av den grenade aminosyran leucin sammanföll med tidpunkten då hästarna blev insulinresistenta, vilket kan indikera att det finns ett samband mellan förhöjda koncentrationer av grenade aminosyror (framförallt leucin) och nedsatt insulinkänslighet hos häst, precis som man sett hos människa (Luzi, Castellino & DeFronzo, 1996; Argilés *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006). Eftersom leucin är en potent stimulerare av insulin så kan det även vara så att leucinkoncentrationerna stiger i ett försök att stimulera insulinets effekt (Manders *et al.*, 2012).

Kopplingen mellan höga koncentrationer av de grenade aminosyrorerna och insulinresistens har framförallt setts hos människor och djur med övervikt och en felaktig nedbrytning av de grenade aminosyrorerna i fettväv tros vara en bidragande faktor (Lu *et al.*, 2013). Orsaken till de höga aminosyrakoncentrationerna hos insulinresistenta människor och djur anses bland annat bero på ett minskat uttryck/nedreglering av signalvägar i den katabola processen av aminosyrorerna (Luzi, Castellino & DeFronzo, 1996; She *et al.*, 2007). Aminotransferaset BCAT medierar de första stegen i nedbrytningen av de grenade aminosyrorerna i fettväv och muskulatur och ett minskat uttryck av BCAT-genen hos möss ger ökade koncentrationer av cirkulerande aminosyror samt ökad insulintolerans. Detta stödjer teorierna om att en felaktig proteinnedbrytning, som leder till höga koncentrationer av grenade aminosyror, kan kopplas ihop med nedsatt insulinkänslighet (She *et al.*, 2007). Insulin stimulerar cellers upptag av aminosyror, framförallt i muskulatur, och hämmar proteolys och aminosyrautsläpp från muskulatur. Hos en icke insulinresistent individ sänker således insulin aminosyrakoncentrationerna i cirkulationen och stimulerar till proteinsyntes (Felig, 1975; Bayly, Reed & Sellon, 2010). En störd proteinmetabolism på grund av den insulinresistens som ses, skulle således kunna bidra till de höga koncentrationerna av aminosyrorerna i plasma som fås efter infusionens slut (Lu *et al.*, 2013).

Grenade aminosyror stimulerar olika signalvägar, bland annat mTOR, som i sin tur stimulerar proteinsyntes och agerar signalmolekyl mellan aminosyror och insulin (Xu *et al.*, 2001; Kimball & Jefferson, 2004; Lu *et al.*, 2013). mTOR medierar aktivering av insulin receptor substrate 1 (IRS-1), som är det primära substratet för insulinreceptorn, och möjliggör därmed insulinsignalering. Bland de grenade aminosyrorerna är leucin den som har mest aktiverande effekt på IRS-1 (Tzatsos & Kandrór, 2006). En långvarig stimulering av IRS-1 leder till en

nedbrytning av substratet, vilket i sin tur leder till minskad insulinsignalering och nedsatt insulinkänslighet (Kimball & Jefferson, 2004; Xu *et al.*, 2001). Genom att stimulera och aktivera IRS-1 kan höga koncentrationer av de grenade aminosyrorerna bidra till nedsatt insulinkänslighet (Haruta *et al.*, 2000). Det som skulle kunna tala emot att det finns en koppling mellan förhöjda koncentrationer av grenade aminosyror i plasma och insulinresistens hos hästarna i denna studie är det faktum att detta samband framförallt setts hos feta insulinresistenta människor och ej i samband med sepsis och endotoxemi. Detta kan tyda på att det krävs en mer långvarig stimulering av IRS-1 innan detta tillstånd uppstår.

För en individ som drabbas av endotoxemi är det viktigt att få en behandling som bidrar med energi, upprätthåller/stimulerar immunförsvaret, hämmar inflammationen och bevarar muskelprotein (Harper, Miller, & Block, 1984). Aminosyror har flertalet egenskaper som bidrar till att de ges som parenterala supplement till den humana intensivvårdspatienten. De stimulerar proteinsyntes och hämmar proteinnedbrytning och de möjliggör även bildandet av immunförsvarsceller och bidrar således till ett fungerande immunförsvaret (Platell *et al.*, 1993; Newsholme & Calder, 1997; Platell *et al.*, 2000). Specifika aminosyraprekursorer (intermediärer för aminosyrasyntes) har visat sig kunna öka vävnadsperfusionen hos djur och som exempel har aminosyran glycyl-L-histidin har setts minska celldöd hos möss med experimentellt inducerad endotoxemi (Hadley & Hinds, 2002; Wijnands *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2013). Huruvida aminosyrasupplement kan motverka uppkomsten av sjukdomstillstånd som endotoxemi är inte ännu fullständigt bevisat, dock bidrar aminosyrornas egenskaper till att de kan hämma fortskridandet av endotoxemi och sepsis (Platell *et al.*, 1993; Newsholme & Calder, 1997; Platell *et al.*, 2000; Wijnands *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2013).

Parenterala tillskott av aminosyror finns att tillgå även till häst men används generellt inte i Sverige. Det finns väldigt lite forskning kring vad som händer med aminosyrametabolismen hos häst i samband med svåra sjukdomstillstånd som leder till endotoxemi och parenteralterapi till häst baserar sig på humanstudier. Denna studie tyder på att hästar får förändringar i aminosyrametabolismen men fler studier i ämnet behövs. Det skulle bland annat vara intressant att utveckla användningen av parenteralterapi med aminosyror inom hästmedicinen, för att se om det kan bidra till bevarandet av muskelprotein och få en bättre prognos samt snabbare tillfrisknad vid tillstånd som endotoxemi.

Troligtvis är den nedsatta insulinkänsligheten som ses hos häst vid endotoxemi dosberoende och det skulle vara intressant att undersöka huruvida leucin, som stimulerar insulinfrisättning, skulle kunna bidra till bevarande av muskelprotein, förbättrande av immunförsvaret och sårläkning och kanske även till att mildra hyperglykemin (Bröjer *et al.*, 2012). Man har dock sett att människor med sepsis kan bli leucinresistenta (Lang, Frost & Vary, 2007). Detta skulle kunna förklara det faktum att man inte kunnat minska muskelförlusten hos människor med traumatiska skador trots att de fått parenterala tillskott med grenade aminosyror (Platell *et al.*, 2000). Om hästar också blir leucinresistenta är för tidigt att uttala sig om. Ett annat alternativ skulle kunna vara att behandla de endotoxemisjuka hästarna med insulin. Om tillräckligt höga koncentrationer av insulin fås, skulle hästarna kunna ta hand om hyperglykemin, tillgodose sig energi utan uttalad glukoneogenes

och på så vis spara muskelprotein. Detta görs på kliniken, men i dagsläget framförallt för att behandla förhöjda triglyceridkoncentrationer.

Aminosyrakoncentrationerna hos en sjuk patient kan ge information om hur patienten mår och höga koncentrationer av de grenade aminosyrorna har uppmätts hos människor som överlevt katabola sjukdomstillstånd (Freund *et al.*, 1978). Det skulle vara intressant att i framtiden ha någon form av markör för detta, vilket skulle kunna bidra till ett sätt att följa upp effekten av behandling och rehabilitering av hästar med endotoxinemi.

Hästars metabolism är komplex och mer forskning behövs för att förstå hur aminosyrametabolismen förändras under sjukdomstillstånd som endotoxinemi. Det behövs även mer forskning för att få insikt i hur aminosyror påverkar insulinkänsligheten. Huruvida det är resistensen i sig som ger höga koncentrationer av aminosyror eller om det är aminosyrorna som initierar insulinresistens, krävs det mer studier för att få grepp om. En förklaring till diskrepansen studier emellan kan vara att de grenade aminosyrorna inte bidrar direkt till insulinresistens utan snarare är medlöpare i de förändringar som sker då insulinresistens utvecklas. Hästarna i vårt försök uppvisar relativt lindriga symtom på endotoxinemi som kan liknas vid ett tidigt stadium eller en lindrig form av sjukdomstillståndet. Trots detta ses förändringar i aminosyrametabolismen hos samtliga hästar, vilket gör att man kan förvänta sig en än mer påverkad aminosyrametabolism med större förändringar i aminosyrakoncentrationer i plasma hos hästar med en allvarligare form av endotoxinemi. Våra resultat liknar de scenarion som setts hos människa och andra djurslag vid endotoxinemi och sepsis, varför vi hoppas att den här studien kan tjäna som modell för fortsatt forskning inom området i framtiden.

KONKLUSION

En häst med endotoxinemi är dödligt sjuk och kräver därför intensivvård. Utan kunskap om vad som händer med hästens metabolism vid detta tillstånd kan dock inte tillfredställande vård ges och hästen kommer få svårigheter att tillfriskna. Tidigare studier kring hur glukos- och insulinmetabolismen förändras vid endotoxinemi har gjorts men ingen har tidigare studerat hur aminosyrametabolismen förändras. Våra resultat visar att hästarnas aminosyrametabolism förändras vid experimentellt inducerad endotoxinemi, vilket sannolikt bidrar till den muskelförlust som ses hos svårt sjuka hästar och bidrar till svårigheter att tillfriskna. Anmärkningsvärt är också att förändringar i aminosyrakoncentrationerna ses samtidigt som sänkt insulinkänslighet hos hästarna, vilket antyder att det finns kopplingar däremellan. Mer kunskap om hästarnas aminosyrametabolism vid endotoxinemi kommer sannolikt leda till bättre utvärdering och behandling av den svårt sjuka hästens förändrade proteinmetabolism, varvid prognosen för tillfrisknande förbättras.

REFERENSER

- Argilés, J.M. et al., 1999. Mechanism for the increased skeletal muscle protein degradation in the obese Zucker rat. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(4), ss. 244–248.
- Baar, K. & Esser, K., 1999. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *The American journal of physiology*, 276, ss. C120–127.
- Bayly, W.M., Reed, S.M & Sellon, D.C., 2010. *Equine Internal Medicine*. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier.
- Boroni Moreira, A.P. & de Cássia Gonçalves Alfenas, R., 2012. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Nutrición hospitalaria*, 27(2), ss. 382–390.
- Boutry, C. et al., 2012. Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation: a primary intestinal defect? *Amino acids*, 43(4), ss. 1485–1498.
- Braconnot, H.M., 1820. *Sur la conversion des matières animales en nouvelles substances par le moyen de l'acide sulfurique. Annales de Chimie et Physique*. Série 2(13), ss. 113-25
- Bröjer, J.T. et al., 2012. Effect of repeated oral administration of glucose and leucine immediately after exercise on plasma insulin concentration and glycogen synthesis in horses. *American journal of veterinary research*, 73(6), ss. 867–874.
- Burrows, G.E., 1970. Hemodynamic alterations in the anesthetized pony produced by slow intravenous administration of Escherichia coli endotoxin. *American journal of veterinary research*, 31(11), ss. 1975–1982.
- Burrows, G.E. & Cannon, J., 1970. Endotoxemia induced by rapid intravenous injection of Escherichia coli in anesthetized ponies. *American journal of veterinary research*, 31(11), ss. 1967–1973.
- Buse, M.G. & Reid, S.S., 1975. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 56(5), ss. 1250–1261.
- Busquets, S. et al., 2000. Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *Journal of cellular physiology*, 184(3), ss. 380–384.
- Champe, P.C. & Harvey, R.A., 2008. *Biochemistry*. 4. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Deng, H. & Chai, J., 2009. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. *International Immunopharmacology*, 9(11), ss. 1251–1259.
- Fahy, B.G., Sheehy, A.M. & Coursin, D.B., 2009. Glucose control in the intensive care unit. *Critical care medicine*, 37(5), ss. 1769–1776.
- Felig, P., 1975. Amino Acid Metabolism in Man. *Annual Review of Biochemistry*, 44(1), ss. 933–955.

- Freund, H. et al., 1978. Amino acid derangements in patients with sepsis: treatment with branched amino acid rich infusions. *Ann Surg*, 188(3), ss. 423-30.
- Fulks, R.M., Li, J.B. & Goldberg, A.L., 1975. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *Journal of Biological Chemistry*, 250(1), ss. 290–298.
- Gamrin, L. et al., 1997. Longitudinal changes of biochemical parameters in muscle during critical illness. *Metabolism: clinical and experimental*, 46(7), ss. 756–762.
- Gannon, M.C. & Nuttall, F.Q., 2010. Amino acid ingestion and glucose metabolism--a review. *IUBMB life*, 62(9), ss. 660–668.
- Greiwe, J.S. et al., 2001. Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 281(3), ss. E466–471.
- Hadley, J.S. & Hinds, C.J., 2002. Anabolic strategies in critical illness. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(6), ss.700–707.
- Harper, A.E., Miller, R.H. & Block, K.P., 1984. Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 4(1), ss. 409–454.
- Holeček, M., 2002. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition*, 18(2), ss. 130–133.
- Kamisoglu, K. et al., 2013. Temporal metabolic profiling of plasma during endotoxemia in humans. *Shock (Augusta, Ga.)*, 40(6), ss. 519–526.
- Kimball, S.R. & Jefferson, L.S., 2004. Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(2), ss. 423–427.
- Lang, C.H., Frost, R.A. & Vary, T.C., 2007. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(2), ss. 453–459.
- Langley, J. & Adams, G., 2007. Insulin-based regimens decrease mortality rates in critically ill patients: a systematic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 23(3), ss. 184–192.
- Langouche, L. & Van den Berghe, G., 2006. Glucose Metabolism and Insulin Therapy. *Critical Care Clinics*, 22(1), ss. 119–129.
- Lehmann, C. et al., 2007. Tyrosine phosphorylation modulates rat vascular response to experimental endotoxemia in vivo and in vitro. *Critical Care*, 11(2), ss. 6.
- Liu, Z. et al., 2006. The Regulation of Body and Skeletal Muscle Protein Metabolism by Hormones and Amino Acids. *The Journal of Nutrition*, 136(1), ss. 212–217.
- Lu, J. et al., 2013. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Frontiers of Medicine*, 7(1), ss. 53–59.

- Luzi, L., Castellino, P. & DeFronzo, R.A., 1996. Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *The American journal of physiology*, 270(2), ss. 273–281.
- Manders, R. et al., 2012. Insulinotropic and Muscle Protein Synthetic Effects of Branched-Chain Amino Acids: Potential Therapy for Type 2 Diabetes and Sarcopenia. *Nutrients*, 4(12), ss. 1664–1678.
- Newsholme, P. et al., 2005. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical science (London, England: 1979)*, 108(3), ss. 185–194.
- Pfeiffer, R., 1892. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z Hyg*, Vol 11, ss. 393–411.
- Platell, C. et al., 2000. Branched-chain amino acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(7), ss. 706–717.
- Rybka, J., 2010. [Glycaemia control in critically ill patients is justified and effective]. *Intensive Care Medicine*, 56(9), ss. 977–987.
- She, P. et al., 2007. Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell metabolism*, 6(3), ss. 181–194.
- Spier, S.J. et al., 1989. Protection against clinical endotoxemia in horses by using plasma containing antibody to an Rc mutant E. coli (J5). *Circulatory shock*, 28(3), ss. 235–248.
- Sundström, A. 2011. Förändringar i serumglukos och plasmainsulin vid experimentell endotoxinemi hos häst. *Sveriges Lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet* (Examensarbete 2011:36).
- Sykes, B.W. & Furr, M.O., 2005. Equine endotoxaemia--a state-of-the-art review of therapy. *Australian veterinary journal*, 83(1-2), ss. 45–50.
- Tadros, E.M. et al., 2013. Effects of intravenous lipopolysaccharide infusion on glucose and insulin dynamics in horses with equine metabolic syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 74(7), ss. 1020–1029.
- Tóth, F. et al., 2010. Effects of pretreatment with dexamethasone or levothyroxine sodium on endotoxin-induced alterations in glucose and insulin dynamics in horses. *American journal of veterinary research*, 71(1), ss. 60–68.
- Tzatsos, A. & Kandrór, K.V., 2006. Nutrients Suppress Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling via Raptor-Dependent mTOR-Mediated Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), ss. 63–76.
- Ueki, K., Kondo, T. & Kahn, C.R., 2004. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 24(12), ss. 5434–5446.
- Vary, T.C., 1998. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 1(2), ss. 217–224.

- Vesali, R.F. et al., 2005. Amino acid metabolism in leg muscle after an endotoxin injection in healthy volunteers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 288(2), ss. 360–364.
- Wang, X. et al., 2006. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*, 147(9), ss. 4160–4168.
- Wijnands, K.A.P. et al., 2012. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PloS one*, 7(5), p.e37439.
- Xu, G. et al., 2001. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 50(2), ss. 353–360.
- Yarandi, S.S. et al., 2011. Amino acid composition in parenteral nutrition: what is the evidence? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(1), ss. 75–82.